



# Studies on the Strigolactone Signaling Pathway Mediated by an / -fold Hydrolase in *Arabidopsis thaliana*

著者	曹 萌萌
号	12
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第295号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/60333">http://hdl.handle.net/10097/60333</a>

	かお めんめん
氏 名（本 籍 地）	曹 萌萌
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第295号
学位授与年月日	平成27年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科，専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）分子生命科学専攻
論 文 題 目	Studies on the Strigolactone Signaling Pathway Mediated by an $\alpha/\beta$ -fold Hydrolase in Arabidopsis （シロイヌナズナにおける加水分解酵素を介したストリゴラ クトン信号伝達経路に関する研究）
博士論文審査委員	（主査） 教 授 山口 信次郎 教 授 草野 友延 教 授 村本 光二

## 論文内容の要旨

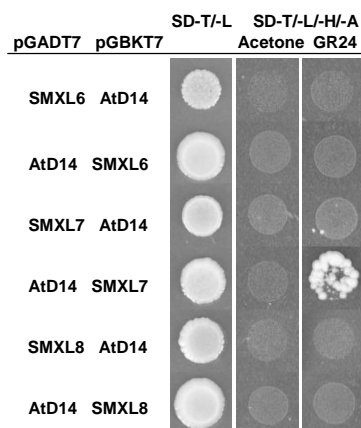
Strigolactones (SLs) are plant hormones that play an important role in shoot branching regulation. They also function as root-derived signals for parasitic and symbiotic interactions. The rice DWARF14 (D14; AtD14 in Arabidopsis), an  $\alpha/\beta$ -fold hydrolase family protein, functions as a possible SL receptor. D53 was characterized from a rice SL-insensitive mutant as a repressor of the SL signaling pathway. D53 interacted with D14 in an SL-dependent manner, and was degraded through the 26S proteasomal pathway in an SCF<sup>D53</sup>-dependent manner. The SL signaling repressors in Arabidopsis have not been identified. Therefore, we performed functional analysis of Arabidopsis D53 homologs. This work is presented in Chapter 1. An AtD14 paralog in Arabidopsis called HYPOSENSITIVE TO LIGHT (HTL)/KARRIKIN-INSENSITIVE2 (KAI2) has been identified, but the KAI2 signaling mechanism has not been elucidated. To examine the KAI2 signaling mechanism, I prepared KAI2 active-site mutants and analyzed their functions. These results are presented in Chapter 2.

### Chapter 1: Studies on the SL signaling pathway mediated by an $\alpha/\beta$ -fold hydrolase in Arabidopsis

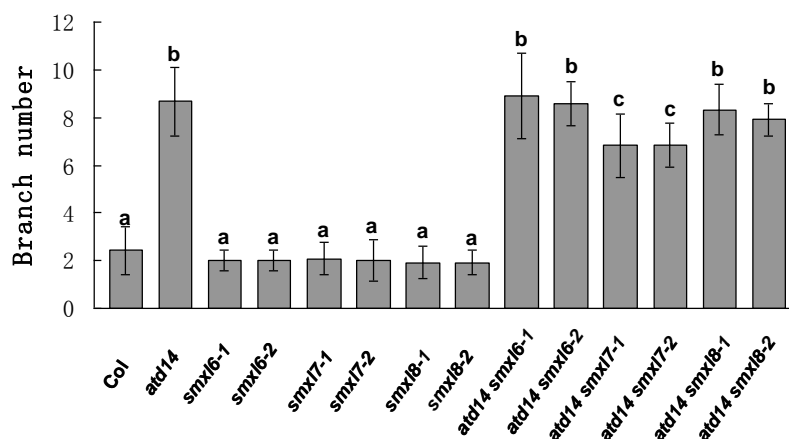
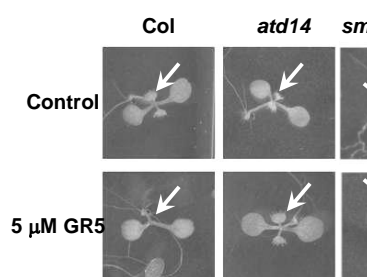
Arabidopsis possesses three *D53* homologous genes called *SMXL6*, *SMXL7*, and *SMXL8*. I tested the interaction between a potential SL receptor, AtD14, and these SMXL proteins by yeast two-hybrid (Y2H) analyses. Yeast cells carrying AtD14-AD and SMXL7-BD had favorable growth in the presence of the SL synthetic analog GR24, suggesting that AtD14 physically interacted with SMXL7 in a GR24-dependent manner (Fig. 1). I found that SMXL6 weakly interacted with AtD14 under mildly selective conditions. To analyze SMXLs function, we generated Arabidopsis *atd14 smxl6*, *atd14 smxl7*, and *atd14 smxl8* double-knockout mutants. Only the *atd14 smxl7* mutant showed partial suppression of the *atd14* shoot branching phenotype (Fig. 2). I also generated *smxl6 smxl7* and *smxl6 smxl8* double-knockout mutants, and found that only *smxl6 smxl7* showed a delay in development of true leaves in the absence of GR24 (Fig. 3). The same phenotype was observed in WT plants treated with the synthetic SL analog GR5 (Fig. 3), suggesting that the *smxl6 smxl7* double mutant exhibited a constitutive SL response phenotype. These results demonstrate that SMXL7, and to a lesser extent SMXL6, function as repressors in the Arabidopsis SL signaling pathway.

The  $\alpha/\beta$ -hydrolase family proteins contain a conserved catalytic triad (Ser-His-Asp), and these amino acids are necessary for enzymatic catalysis. To analyze the importance of the AtD14 catalytic triad for interaction with SMXL7, I performed Y2H experiments using point mutant proteins (AtD14:S97A, AtD14:H247A, and AtD14:D218A). Our previous studies showed that these three point mutants drastically reduced the hydrolase activity in *vitro*. AtD14:D218A, but not AtD14:S97A and AtD14:H247A, complemented the *atd14* mutant phenotype. In agreement with the complementation results, Y2H experiments showed that only AtD14:D218A interacted with SMXL7 in the presence of GR24. These results suggest that AtD14 hydrolase activity is not necessary for formation of the AtD14-SMXL7 complex.

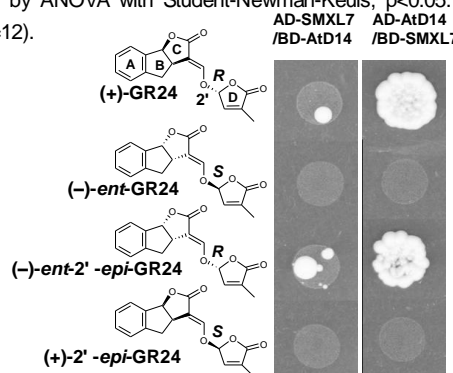
I also examined the SL structural requirements for the interaction between AtD14 and SMXL7 using Y2H methods. Previous work showed that the SL (2' *R*) configuration and the enol ether bridge are crucial for shoot branching inhibition in rice and Arabidopsis. In agreement, I found that only the (2' *R*) SL stereoisomers induced the AtD14-SMXL7 and D14-D53 interactions (Fig. 4). The derivative 3,6'-dihydroGR24, in which the enol ether double bond is replaced by a single bond, did not induce the AtD14-SMXL7 and D14-D53 interactions. These results reveal good correlation between the biological activities of tested compounds and the important stereostructural characteristics of SLs for inducing formation of the potential receptor complex.



**Figure 1.** Interaction between AtD14 and SMXL6, SMXL7, or SMXL8 in Y2H.



**Figure 2.** Branching number of the single and double mutants. Statistical groupings were determined by ANOVA with Student-Newman-Keuls,  $p < 0.05$ . Data are the mean  $\pm$  SD ( $n=12$ ).



AtD14 and KAI2 are quite similar

downstream signaling component. KAI2 functions in the perception of a smoke-derived germination stimulant called karrikin (KAR). The endogenous ligand (substrate) of KAI2 has not been identified, and the Arabidopsis KAI2 signaling pathway has not been fully elucidated. To understand the importance of the catalytic triad amino acid residues for KAI2 biological function, we performed complementation tests using three KAI2 mutant proteins (KAI2:S95A, KAI2:H246A, and KAI2:D217A) in the Arabidopsis *kai2* mutant. The *kai2* mutant exhibits an elongated hypocotyl phenotype and delayed seed germination compared with those of WT plants. None of the point mutants complemented the *kai2* elongated hypocotyl phenotype. However, KAI2:S95A could partly complement the delayed germination phenotype of *kai2* mutant seeds. These results suggest that the KAI2 hydrolase activity is not necessary, at least for Arabidopsis seed germination. Further experiments are required to fully elucidate this system.

## Conclusion

Our results conclusively demonstrate that SMXL6 and SMXL7 function as repressors in the SL signaling pathway in Arabidopsis. We used Y2H experiments to clarify important parameters for the AtD14-SMXL7 interaction, and identified the AtD14 catalytic triad and the SL stereochemistry. Although additional experiments are needed to understand KAI2 function in Arabidopsis, I provided data supporting the important role of the catalytic triad for KAI2 function.

## Publication list

Mikihisa Umehara\*, Mengmeng Cao\* et al. Structural Requirements of Strigolactones for Shoot Branching Inhibition in Rice and Arabidopsis. Plant & Cell Physiology. (\*equal contribution, under review)

## 論文審査結果の要旨

曹萌萌は、枝分かれの抑制等に働く植物ホルモンであるストリゴラクトンの信号伝達経路において新たな知見を得ることを目的に研究を行った。研究開始当初は、受容体と考えられる $\alpha/\beta$ -ヒドロラーゼである AtD14 と F-box タンパク質である MAX2 が信号伝達に関わる正の因子として遺伝学的に同定されていた。曹萌萌は、同経路で機能すると予想されるリプレッサー（負の制御因子）を同定するため、AtD14 とストリゴラクトン依存的に結合するタンパク質を tandem affinity purification (TAP) 法により探索した。当実験を行っている過程で、他の研究グループにより、イネのストリゴラクトン信号伝達経路におけるリプレッサーとして DWARF53 (D53) と呼ばれるタンパク質が突然変異体の解析から同定された。そこで、シロイヌナズナの *D53* 類似遺伝子である *SMXL6*、*SMXL7*、*SMXL8* の解析を行った。まず、酵母ツーハイブリッド法により、*SMXL6* と *SMXL7* が AtD14 とストリゴラクトン依存的に相互作用することを明らかにした。また、*SMXL6*、*SMXL7*、*SMXL8* の挿入変異体をそれぞれ2アレルずつ取得し、逆遺伝学的解析を行った。その結果、*SMXL7* がシロイヌナズナのストリゴラクトン信号伝達経路における主要なリプレッサーであることが明らかになった。また、二重変異体の解析から、*SMXL6* が *SMXL7* と重複した機能をもつことも示された。曹萌萌はさらに、AtD14 と *SMXL7* の相互作用におけるストリゴラクトンの構造要求性について検討を行った。これまでの研究により、ストリゴラクトンの枝分かれ抑制活性には、2'位の立体配置やエノールエーテル架橋の二重結合が重要であることが所属研究室で明らかにされていた。曹萌萌は、これらの部分構造が、AtD14 と *SMXL7* との相互作用においても重要であることを見出した。次に、AtD14 の加水分解酵素活性に重要な触媒三つ組残基 (Ser, Asp, His) が AtD14 と *SMXL7* との相互作用に重要であるかどうかを調べた。その結果、Ser または His を Ala に変えると AtD14 と *SMXL7* の相互作用は検出されないが、Asp を Ala に変えた変異体においては AtD14-*SMXL7* の相互作用が観察された。最近、シロイヌナズナ植物体内において、AtD14-GUS などの融合タンパク質がストリゴラクトン処理によって顕著に分解されることが報告された。一方、曹萌萌はシロイヌナズナの内生 AtD14 タンパク質はストリゴラクトン処理後に顕著な分解を受けないことを明らかにした。

以上の研究成果は、曹萌萌が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、曹萌萌提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。